

泌乳牛における高温環境下の酸化ストレス評価とその低減に関する研究

著者	田中 正仁
号	48
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	農第759号
URL	http://hdl.handle.net/10097/60223

たなか まさひと

氏 名（本 籍 地） 田 中 正 仁

学 位 の 種 類 博士（農学）

学 位 記 番 号 農第 759 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 24 年 3 月 8 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 2 項

論 文 題 目 泌乳牛における高温環境下の酸化ストレス評価とその低減に関する研究

博士論文審査委員（主査）教 授 中 井 裕

教 授 加 藤 和 雄

教 授 佐 藤 衆 介

論文内容要旨

泌乳牛における高温環境下の 酸化ストレス評価とその低減に関する研究

緒論

ホルスタイン種泌乳牛は、体内で発生する熱量を体外へ放出しにくくなる夏季高温多湿期間には、蓄熱量が増加し、日常的な体温上昇が観察される。そして、体温上昇を抑制するために飼料摂取量が減少し、泌乳量の減少や各種の代謝疾患が顕在化する。このとき、泌乳牛の体内における生理学的変化の一つとして、酸化ストレスの亢進が考えられている。酸化ストレスは、培養細胞や実験小動物および人に於いて代謝活性の阻害や細胞、個体の老化、腫瘍、各種代謝障害の原因の一つと考えられている。しかし、酸化ストレスの実態の評価については、どのような指標をどのように評価すべきなのか、そしてその対策として何をなすべきかについてなど不明確な点が多く残されている。泌乳牛における酸化ストレスの実態に関して、とくに高温環境との関係については十分な情報が得られていない。さらに、泌乳生産性と酸化ストレスとの関係について、また、酸化ストレスの人為的な制御方法についての研究は少ない。そこで本研究では、高温環境下の泌乳牛における酸化ストレスの実態および評価とその低減技術の開発を目的として、①泌乳牛における酸化ストレスの実態を血漿中の複数の酸化ストレス指標から評価し、それらの酸化ストレス指標の高温期における変動様式を解明した。さらに、特に代謝的なストレスが加わる夏季高温期の分娩前後における酸化ストレス指標の変動を明らかにし、②酸化ストレスと泌乳生産性の関係を示した。そして、③酸化ストレスの制御方法についてアスコルビン酸投与の効果について検討し、さらに抗酸化成分を含む食品加工残渣等の給与効果について調べた。

第1章 乳牛における酸化ストレス指標とその変動要因

第1節 泌乳牛の血漿成分中の酸化ストレス指標の変動

泌乳牛の代謝ストレスの一つである酸化ストレスに関する報告は少なく、泌乳牛の生産性維持と飼育管理技術の向上には、酸化ストレスの程度を詳細に把握する必要がある。そこで、泌乳牛の血漿中に存在し、還元能力を持つスルフヒドリル基に着目し、その抗ラジカル能力および他の酸化ストレス指標との関係について検討した。還元型グルタチオン溶液のSH基および泌乳牛血漿中に存在するスルフヒドリル基は、ペルオキシラジカル発生試薬である2,2'-azobis(2-amidinopropane)hydrochloride (A B A P)の添加によって時間依存的に有意に減少した ($P<0.05$) (Fig 1)。また、ペルオキシラジカルによる還元型グルタチオンの減少は、水溶性抗酸化ビタミンであるアスコルビン酸の添加で抑制された ($P<0.05$) (Fig 1)。泌乳牛15頭の頸静脈から採取した新鮮血漿中において、スルフヒドリル基濃度とアルブミン濃度との間には有意な正の相関関係があり ($P<0.05$) (Fig 2)、アスコルビン酸濃度とスルフヒドリル基の間には、有意ではないものの正の相関関係 ($P<0.10$) (Fig 3)があった。以上のことから、泌乳牛血漿中に存在するスルフヒドリル基は、抗ラジカル能力があり、泌乳牛血漿の酸化ストレス指標となることが示唆された。

第2節 高温環境下における泌乳牛血漿中の酸化ストレス指標の変動

高温環境下の酸化ストレス亢進については、細胞レベルから組織レベル、実験動物個体レベルまでの知見が蓄積されつつある。一方、高温環境下の泌乳牛では生産性低下が顕著であるが、酸化ストレスとの関係については不明な点が多い。そこで、延べ128頭の泌乳牛血漿中における環境温度と酸化ストレス指標の変動について検討した。ある年の熊本における日最高気温の月平均は1月に9.2℃であったが、7-8月には32℃に達した。夏季には、環境温度の上昇に伴って月平均の直腸温度も上昇し、8月には39℃以上に達した(Fig 4)。血漿中の還元性成分であるスルフヒドリル基($P<0.05$)とアスコルビン酸濃度($P<0.01$)は、環境温度が高い7月には12月に比較して顕著に低下し、多価不飽和脂肪酸の酸化によって生成されるチオバルビタール酸反応物(TBARS)濃度は増加した($P<0.05$)(Table 1)。そして、スルフヒドリル基とアスコルビン酸濃度($P<0.01$)の間には有意な正の相関関係が認められ、直腸温度とアスコルビン酸濃度($P<0.01$)の間には負の有意な相関関係が認められた。TBARSとアスコルビン酸濃度の間には有意な関係が認められなかった(Table 2)。これらのことから、高温環境下では泌乳牛の酸化ストレスが亢進するが、血中の酸化ストレス指標の反応は一樣ではなく異なるメカニズムの存在が示唆された。

第3節 高温環境下の分娩前後の酸化ストレス指標の変動

高温環境下の分娩前後における乳牛血漿中の酸化ストレス指標の変動について調べた。乳牛10頭を用いて分娩前5日から分娩後11日までの間を1期(分娩前5日から1日)、2期(分娩日から分娩後5日)、3期(分娩後6日から11日)に分けて採血した。直腸温度は試験期間を通して39℃以上であった(Table 3)。アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(ASAT)活性は2期と3期で有意に高く($P<0.05$)、血中尿素態窒素は3期で高かった($P<0.05$)(Table 4)。アスコルビン酸濃度は2期で低く($P<0.05$)、TBARS濃度は2期と3期で高かった($P<0.05$)。試験期間を通してTBARS濃度とASAT活性の間には正の有意な相関関係が認められた($P<0.05$)(Table 5)。分娩後の泌乳量や体重の減少と各種酸化ストレス指標との間には有意な関係は認められなかった。これらは、高温環境下の分娩後には酸化ストレスが亢進していることを示している。

第2章 泌乳牛における酸化ストレス指標の変動と泌乳生産性

夏季高温環境下のホルスタイン種初産牛について血漿中の酸化ストレス指標であるSH基とアスコルビン酸濃度の変動と泌乳成績の関係について検討した。直腸温度と酸化ストレス指標の間には負の有意な相関関係が認められ、スルフヒドリル基では $r=-0.38$ ($P<0.05$)(Fig 4)、アスコルビン酸では $r=-0.34$ ($P<0.05$)であった。乳期と直腸温度の間には一定の関係が認められなかった。泌乳量はアスコルビン酸濃度とは有意な正の相関関係($r=0.47, P<0.05$)が認められた。しかし、SH基濃度との間には有意な関係が認められなかった。また、血漿中のスルフヒドリル基濃度と乳糖率($r=0.35, P<0.05$)、乳タンパク質率($r=0.38, P<0.05$)、無脂固形分率($r=-0.47, P<0.05$)の間には有意な正の相関関係があったが、乳脂肪率とは認められなかった。一方、アスコルビン酸濃度と乳脂肪率($r=-0.34, P<0.05$)、乳タンパク質率($r=-0.49, P<0.05$)との間には負の有意な相関関係

係が見られたが、乳糖率とは正の相関関係 ($r=0.52$, $P<0.05$) が認められた。各成分の日生産量(g/日)では、アスコルビン酸濃度とタンパク質量 ($r=0.42$, $P<0.05$)、乳糖量 ($r=0.61$, $P<0.05$)、無脂固形分量 ($r=0.56$, $P<0.05$) との間に正の相関が見られた (Table 6)。これらのことは、酸化ストレスの亢進と泌乳生産性低下の間に密接な関係が存在することを示唆している。

第3章 泌乳牛における酸化ストレス制御

第1節 ビタミンC投与が血漿中酸化ストレス指標に及ぼす影響

夏季高温環境下のホルスタイン種乳牛に対するアスコルビン酸投与が血漿中の酸化ストレスマーカーであるスルフヒドリル基、TBARS、アスコルビン酸濃度および泌乳成績に対する影響を調べた。アスコルビン酸として1頭あたり150g/日を5頭の泌乳牛に13日間、強制経口投与し、無投与の泌乳牛5頭と比較検討した。日泌乳量および乳脂肪率、乳タンパク質率、乳糖率の各種乳成分は、アスコルビン酸投与の影響を受けなかった。アスコルビン酸の投与は、血漿中の総アスコルビン酸濃度を投与前および無投与の対照群と比較して増加させた ($P<0.05$)。しかし、酸化ストレスマーカーであるスルフヒドリル基およびTBARS濃度は変動しなかった (Table 7)。また、血漿中のアスコルビン酸濃度とSH基濃度、TBARS濃度および泌乳量と各種乳成分の間には一定の関係は認められなかった。

これらのことは夏季高温期における還元性ビタミン類に泌乳牛への給与は、酸化ストレス低減に有効であることを示唆している。

第2節 抗酸化性飼料としてのミカンジュース粕の給与が血漿中酸化ストレス指標に及ぼす影響

温州ミカンジュース粕はベータクリプトキサンチンなどの抗酸化成分に富んでいる。泌乳牛4頭にミカンジュース粕サイレージを乾物で20%含むTMR (TDN=70.4%, Crude Protein=14.1%)を2週間給与し血球、血漿成分および泌乳成績について対照区と比較した。乾物摂取量や血球成分および血漿成分、泌乳成績に顕著な差は見られなかったが、血漿中のベータクリプトキサンチン濃度は対照区と比較して約20倍 ($P<0.05$)に増加した (Table 8)。また、乳脂肪中の同濃度も約3倍になった (Table 8)。次にミカンジュース粕を15%含むTMRを8頭の泌乳牛に30日間給与した。血球、血漿成分および泌乳成績に顕著な差は見られなかったが、血漿中のベータクリプトキサンチン濃度は約20倍に増加した (Table 9)。ミカンジュース粕サイレージを乾物で15-20%給与した場合、乳牛の血漿中および乳中のベータクリプトキサンチン濃度を上昇させることで酸化ストレスを低減させることが示唆された。

第3節 抗酸化飼料としてのトウモロコシ由来エタノール発酵残渣 (DDGS) の給与が乳牛の酸化ストレスに及ぼす影響

トウモロコシ由来のエタノール発酵残渣 (DDGS) は、発酵過程で濃縮、生成される脂肪やビタミンEなどを含み抗酸化機能をもつものと考えられている。6頭のホルスタイン種乳牛を2群に分け、試験区にはDDGSを乾物換算で20%含む混合飼料を給与し、対照

区には DDGS を含まない混合飼料をそれぞれ夏季高温期に 17 日間給与した。乳成分においては DDGS 給与区で乳タンパク質率が低下し乳糖率が上昇した (Table 10)。血中のスルフヒドリル基濃度及びアスコルビン酸濃度は、DDGS 区で高い傾向にあった。しかし、TBARS 濃度は DDGS 区で有意に低かった (Table 11)。DDGS 給与は、泌乳牛の夏季高温による酸化ストレスを緩和することを示している。

これらの結果は、還元性成分に富む安価な食品加工残渣（エコフィード）の泌乳牛への給与は、夏季高温期の乳牛の酸化ストレス低減に有効であることを示唆している (Fig 5)。

総括

1. 乳牛の血漿中還元性成分であるスルフヒドリル基の濃度は、インビトロにおけるラジカル発生試薬の添加で時間および温度、ラジカル発生試薬の濃度依存的に減少し、その減少は還元性成分であるアスコルビン酸や還元型グルタチオンの添加で抑制される。インビボにおいて血漿中のアスコルビン酸濃度と正の相関関係が示された。血漿中スルフヒドリル基濃度の変動は、乳牛の酸化ストレスの指標の一つとして有効であることを示した。高温環境下の泌乳牛では、血漿中のスルフヒドリル基、アスコルビン酸および TBARS などの酸化ストレス指標の変動から酸化ストレスが亢進していることを示した。さらに、夏季の分娩牛に於いては、分娩後の酸化ストレスの亢進が明らかにされた。
2. 夏季高温期の泌乳牛において、血中の酸化ストレス指標と泌乳成績の関係を明らかにし、酸化ストレスの亢進は、泌乳量、乳成分の低下と関係があることを示した。
3. 泌乳牛に対する還元性成分の投与は、血中の酸化ストレス指標に影響を及ぼし、酸化ストレスの低減に有効であることを示した。さらに、温州ミカンジュース粕（ペータクリプトキサンチン）やトウモロコシ由来エタノール発酵残渣などの抗酸化成分に富む食品加工残渣の抗酸化飼料としての有効性を検証した。

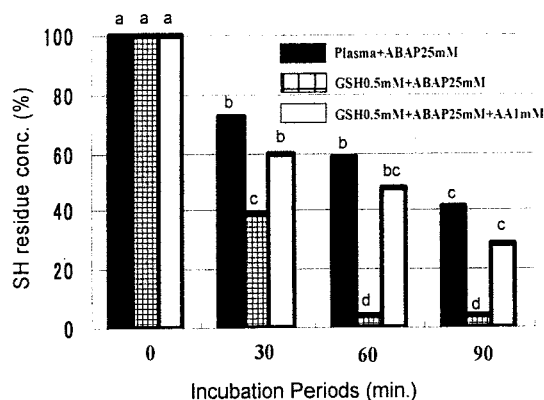


Fig. 1. Effect of ABAP on SH residue oxidation in bovine plasma and GSH solution. Dairy cow plasma and 0.5 mM reduced glutathione solution with or without 1 mM ascorbic acid (AA) was incubated with 25 mM (final concentration) of ABAP at 38 °C for 0 to 90 minutes. Values with different letters in figure are different significantly ($P<0.05$).

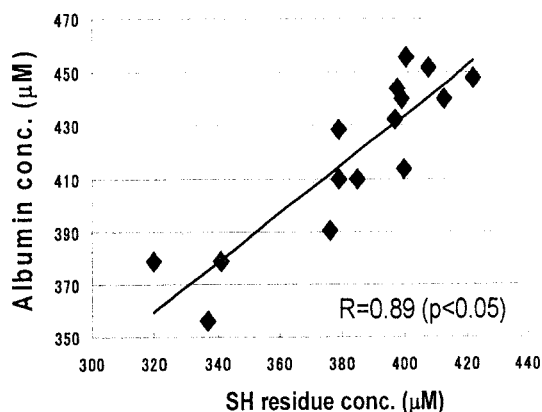


Fig. 2. Relationship with SH residue concentration and albumin in dairy cattle plasma. Each plasma was collected from fifteen dairy cows and analyzed immediately.

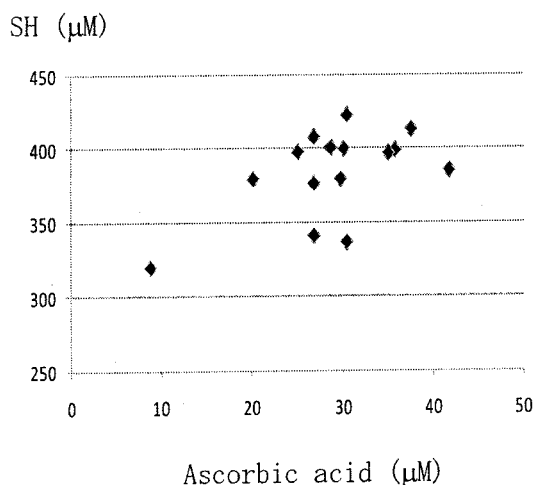


Fig. 3. Relationship with SH residue and total ascorbic acid concentration in dairy cattle plasma. Each plasma was collected from fifteen dairy cows and analyzed immediately.

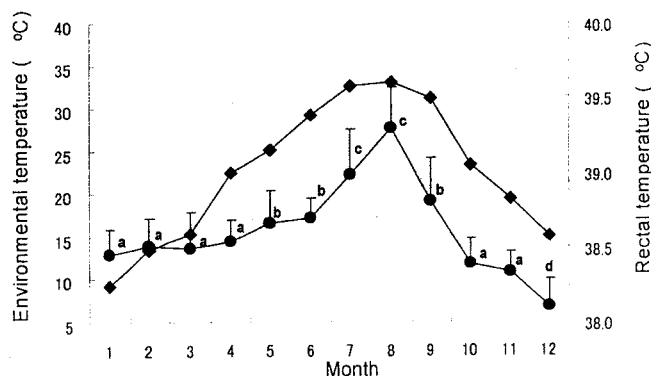


Figure 4 Changes of rectal and environmental temperature through all seasons
Month averages of rectal temperature(-●-) from nine to seventeen cows were obtained after morning milking. Environmental temperature mean month averages of maximum temperature in a day (-◆-). Individual numbers calculated on each month were 9 to 17 cows. Different letter means significant differences ($P<0.05$) in same line.

Table1 Comparison of oxidative stress markers in dairy cows plasma under hot and cold condition

	Alb ^a mg/mL	SH ^b μM	AA ^c μM	TBARS ^d nM	RT ^e °C	ET ^f °C
July						
mean	30.6	373.6*	22.9**	63.8*	39.0**	32.6
SD	2.4	29.2	6.3	4.9	0.3	1.4
December						
mean	30.0	405.5	35.4	56.3	38.1	14.9
SD	1.6	22.9	4.0	4.3	0.2	3.7

Each value was calculated from 11 dairy cows.

* or ** means significant differences in same column at a level of 0.05 or 0.01, respectively. a: plasma albumin, b: sulfhydryl residue, c: ascorbic acid, d: thiobarbituric acid reactive substance, e: rectal temperature, f: a month average of maximum temperature in a day.

Table 2 Correlation coefficients of each oxidative stress marker and rectal temperature

	AA	TBARS	RT
SH	0.37**	-0.23*	-0.15NS
AA	—	-0.03NS	-0.45**
TBARS	—	—	0.23*

Each constant was calculated by 128 dairy cows through a year.

* or ** means significant differences in same column at a level of 0.05 or 0.01, respectively.

SH: sulfhydryl residue, AA: ascorbic acid, TBARS: thiobarbituric acid reactive substances, PT: rectal temperature, NS: not significant.

Table 3 Alterlations of rectal temperature and milk production around parturition of dairy cows

Period	RT(°C)	Milk (kg/day)
1	39.0	—
	0.4	—
2	39.3	17.9
	0.4	4.36
3	39.5	27.2
	0.5	5.06

Values were expressed mean (upper) ± SD (lower).

Period 1,2,3 were showed in "Materials and Methods" section. N=10

Table 4 Alterlations of plasma components around parturition in hot season

Period	GGT(u/L)	AST(u/L)	BUN(mg/dL)	Ca(mg/dL)
1	23.0	54.2 ^b	10.4 ^a	10.3
	4.1	6.7	1.6	0.4
2	27.4	86.9 ^a	8.2 ^b	9.8
	4.7	23.8	2.8	0.8
3	26.0	88.2 ^a	6.3 ^b	10.4
	5.0	22.2	2.2	0.7

Values were expressed mean (upper) \pm SD (lower).

Period 1,2,3 were described in "Materials and Methods" section.

Different letter mean significant difference in same column ($P < 0.05$). n=10.

GGT:gamma-glutamyltranspeptidase, AST:aspartate aminotransferase, BUN: blood urea nitrogen, Ca: calsium

Table 5. Changes of oxidative stress markers in plasma
from cows around parturition in hot condition

Period	SH (μ M)	Ascorbic acid (μ M)	PAO(μ M)	TBARS (nM)
1	371.3	22.2 ^a	822.6	51.7 ^b
	19.6	3.5	156.5	6.5
2	374.5	17.7 ^b	826.0	67.4 ^a
	29.3	3.0	153.5	13.6
3	376.4	20.7 ^a	938.1	76.3 ^a
	30.8	3.0	137.7	14.2

Values were expressed mean (upper) \pm SD (lower).

Period 1,2,3 were showed in "Materials and Methods" section

Different letter mean significant difference in same column ($P < 0.05$). n=10.

SH: sulfhydryl residue, PAO: potential antioxidants, TBARS: thiobarbituric acid reactive substances.

Table 6 Coefficients of correlation with milking performance
and concentrations of antioxidants in cow plasma

	SH	ascorbic acid
milk production(kg/day)	-0.20	0.47*
Fat(%)	0.04	-0.34*
Pro(%)	0.38*	-0.49*
Lac(%)	0.35*	0.52*
SNF(%)	0.47*	-0.28
Fat(g/day)	-0.11	0.31
Pro(g/day)	-0.04	0.42*
Lac(g/day)	-0.11	0.61*
SNF(g/day)	-0.10	0.56*

*: $P < 0.05$. n=38.

Table7 Changes of oxidative stress markers in plasma by administration of ascorbic acid to dairy cows

	Before administration			After administration		
	AA μM	SH μM	TBARS nM	AA μM	SH μM	TBARS nM
Control	29.8 9.1	444.2 23.7	71.5 8.6	25.3 8.6	411.5 36.1	78.2 12.7
AA	30.3 4.0	416.8 18.7	77.1 10.5	36.4* 4.0	401.5 23.1	77.2 9.6

Values were expressed mean (upper) and standard deviation (lower) from each 5 cow.

AA:ascorbic acid, SH:sulfhydryl residue, TBARS:thiobarbituric acid reactive substance

*:P<0.05 in same column.

Table 8 Concentration of beta-cryptoxanthin in total mixed ration, plasma and milk fat

		Citrus pulp	Control
Plasma	μg/dL	467.9±81.4*	24.1±9.1
Pooled milk fat	μg/100g	98	30
Intake/day	μg	134400	N.D.
Out put	μg	1131.3	316.9
Transfer rate	%	0.84	N.D.

Citrus pulp silage:2520(μg/100g). N.D.:not determined.*:p<0.05. n=4.

Table 9 Changes of blood and plasma profiles by feeding of citrus pulp silage

		0 day	20 day	30 day
Red blood cells	x10 ⁴ /uL	625.0±56.7	569.7±61.9	575.2±47.0
White blood cells	x10 ² /uL	101±25.1	107.1±31.1	120.7±37.9
Hematocrit values	%	30.3±1.9	28.5±2.8	28.6±2.1
Hemoglobin	g/dL	10.3±0.6	9.6±0.8	9.7±0.7
Protein	mg/mL	83.5±7.4	85.1±7.0	83.3±6.4
Albumin	mg/mL	37.1±7.1	33.5±4.3	40.0±2.1
SH	μM	425.4±22.5	414.2±38.3	407.0±32.5
Ascorbic acid	μM	23.2±5.1	25.3±5.6	24.7±4.5
TBARS	nM	50.6±13.7	63.8±9.3	57.7±6.2
β-Cryptoxanthin	ug/dL	24.3±8.8 ^a	755.7±153.9 ^b	740.1±141.4 ^b

Mean±SD. SH:sulfhydryl residue, TBARS: thiobarbituric acid reactive substances.

a, b:p<0.05. n=8.

Table 10 Effect of DDGS feeding on milk production and components

		Milk ^a (kg/day)	fat (%)	protein (%)	lactose (%)
17d	DDGS	39.2±7.6	3.3±0.2	2.8±0.1	4.7±0.1
	Control	33.2±4.5	3.6±0.6	3.1±0.2*	4.5±0.1*
31d	DDGS	37.8±6.3	3.5±0.3	2.8±0.1	4.7±0.1
	Control	31.5±4.5	3.8±0.6	3.2±0.2*	4.5±0.1*

a: Milk yield was obtained for 5 days production form 3 cows

*: P<0.05

Table 11

Effect of DDGS feeding on oxidative stress markers in cows plasma

		SH (μM)	Ascorbic acid (μM)	TBARS (nM)
17d	DDGS	446.8±19.8	24.7±6.1	57.2±6.2
	Control	427.7±31.6	22.7±5.1	72.6±8.5*
31d	DDGS	454.8±27.2	23.2±9.6	68.3±15.8
	Control	429.7±26.2	21.7±2.5	58.8±21.4

Mean ± SD. *:p<0.05. n=3.

Mean ± SD. n=4. SH:sulphydryl residue, TBARS: thiobarbituric acid reactive substances.

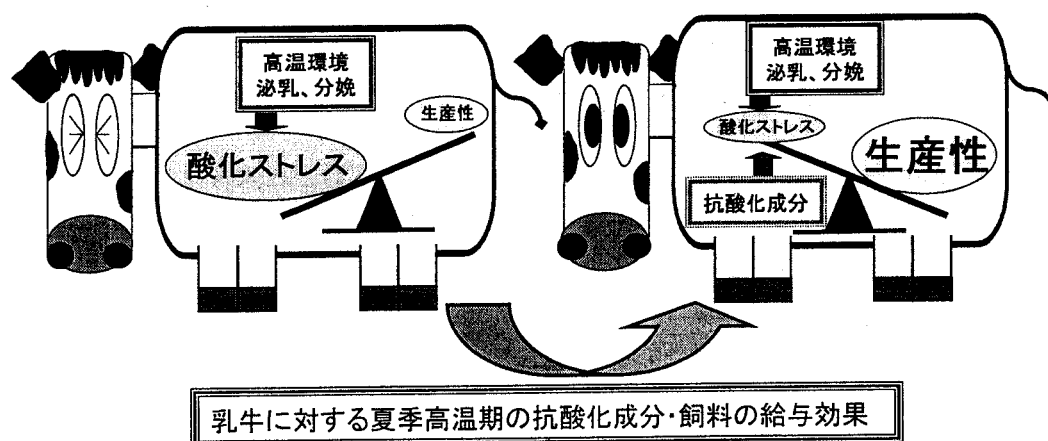


Fig 5. 泌乳牛における酸化ストレス制御と生産性

論文審査結果要旨

本論文は、乳牛体内の酸化ストレスの評価とその変動要因の解析、そして、泌乳生産性との関係および酸化ストレスの制御技術について、泌乳牛の生体を用いて検討した研究成果である。

生体内の酸化ストレスを血漿中のSH基、アスコルビン酸およびチオバルビツール酸反応物濃度の変化から、酸化ストレスポイントとして総合的に評価した点は新しい取り組みであり、高く評価できる。この評価手法に基づいて、夏季高温期間の泌乳牛において、還元性成分であるSH基とアスコルビン酸濃度が低下し、酸化物であるチオバルビツール酸反応物の濃度が増加しており、酸化ストレスポイントの変動から評価して酸化ストレスが亢進していること、夏季の分娩牛においては、分娩後5日間で酸化ストレスの亢進が著しいこと、乳房炎発症牛においては体内の酸化ストレスが亢進していることを明らかにした。この手法によるこれらの一連の結果は、これまでにあまりない成果でありその新規性ととも重要性が高く評価できる。

また、酸化ストレスが、高温期間の泌乳生産性と負の相関があり、泌乳量のみならず、乳脂肪、乳タンパク質、乳糖などの各種乳成分の比率や1日あたりの分泌量との関係を自然環境の中で実際に泌乳牛を用いて明確にしたことは、高く評価できる。

さらに、酸化ストレスの低減手法について、アスコルビン酸などの抗酸化成分の給与が有効なことのみにならず、各地域で飼料素材としての利活用が進んでいるが、抗酸化成分などの有効成分を多く含む素材、その例としてミカンジュース粕やその他の各種食品等加工残渣の給与は、飼料費の節減や飼料自給率の向上の観点から重要である。その有効性を酸化ストレス低減から実証したことは、本研究の成果が酪農の現場でただちに利活用可能であることを示しており、産業現場での普及性が高い研究成果として高く評価できる。

以上の点については、審査員の見解が一致し、以下の結論に至った。

本研究は、生産現場におけるウシを使用して、暑熱ストレスを観察したものであり、新規で重要な知見を与えるものである。とくに畜産現場で実施しうる暑熱ストレスの低減方法の提案も行った点は高く評価される。これらのことから、本論文は、博士論文に相応しいと結論された。